

学位論文（課程博士）

内容要旨

（付）

履歴書

腫瘍・胸部外科

田中 真

平成 30 年 12 月申請

内容要旨目次

主論文

Donor-derived cell-free DNA is associated with acute rejection and decreased oxygenation in primary graft dysfunction after living donor-lobar lung transplantation

(血中ドナー由来遊離 DNA は生体肺移植後の急性拒絶反応と原発性グラフト機能不全における低酸素化と関連する)

田中 真, 杉本誠一郎, 黒崎毅史, 三好健太郎, 大谷真二, 諏澤 憲, 橋田真輔, 山根正修, 大藤剛宏, 豊岡伸一

Scientific Reports 8: Article number 15366 (1-9), 2018

平成 30 年 第 38 回 International Society for Heart and Lung Transplantation に発表

参考文献

Successful Lung Transplantation Using a Deceased Donor Mechanically Ventilated for Ten Months

(10 か月間の人工呼吸器管理下にあった脳死ドナー肺を使用した肺移植の成功例)

田中 真, 三好健太郎, 杉本誠一郎, 山根正修, 小林 求, 大藤剛宏

The Annals of Thoracic Surgery 104: e177-e179, 2017

主論文

Donor-derived cell-free DNA is associated with acute rejection and decreased oxygenation in primary graft dysfunction after living donor-lobar lung transplantation

(血中ドナー由来遊離 DNA は生体肺移植後の急性拒絶反応と原発性グラフト機能不全における低酸素化と関連する)

【緒言】

肺移植後の予後は他の臓器移植より不良である。その主な原因は慢性移植肺機能不全であり、原発性グラフト機能不全や急性拒絶反応がそのリスクファクターである。また、肺移植後の原発性グラフト機能不全は急性拒絶反応の原因でもある。臨床的に脳死肺移植後の急性拒絶反応の標準的な診断法は気管支鏡下肺生検である。しかし、健康な2人のドナーから下葉のみが移植される生体肺移植では、サイズの小さい肺葉に全心拍出血液が流れるため、気管支鏡下生検による出血の危険性が高くなる。このため、生体肺移植後の急性拒絶反応は、通常、臨床所見や画像診断に基づいて診断されるが、侵襲的な気管支鏡下生検の代わりとなるような非侵襲的な診断法が必要とされている。

最近、他の臓器移植や脳死肺移植後の急性拒絶反応の診断において、血中ドナー由来遊離 DNA (dd-cf-DNA) の有用性が報告された。遊離 DNA はアポトーシスや壊死、細胞核 DNA の血中への放出から生じ、血中での半減期は 1.5 時間と短い。このため、dd-cf-DNA は臓器移植後の組織障害である、原発性グラフト機能不全や急性拒絶反応のリアルタイムなバイオマーカーとしての可能性を秘めている。癌研究の領域では、腫瘍から放出された血中遊離 DNA の測定はリキッドバイオプシーとして、診断・治療効果のモニタリングの観点から、その有用性が知られている。

脳死肺移植と異なり、生体肺移植では、虚血時間が短い、移植肺が小さい、血縁関係のドナーから移植される、といった特徴がある。生体肺移植では、肺障害の程度は脳死肺移植よりも軽度な可能性があるため、dd-cf-DNA の定量化が困難な可能性がある。また、血縁関係のドナーが多いため、一塩基多型 (SNP) の類似性により、dd-cf-DNA の同定が困難な可能性もある。このため、生体肺移植後の dd-cf-DNA 測定の実現性や役割は、まだ明らかにされていない。本研究の目的は、生体肺移植後の原発性グラフト機能不全や急性拒絶

反応の診断における dd-cf-DNA 測定の役割を検討することである。

【材料と方法】

対象患者

2011年10月から2016年11月までに、岡山大学病院では22例の生体肺移植が施行された。22例のうち、研究の同意を得られなかった5例と、ドナーとレシピエントを区別するSNPを同定できなかった2例を除いた15例を対象にした。術後14日間の臨床イベントに基づき、急性拒絶反応群（拒絶群）4例、感染群5例、安定群6例の3群に分け、検討を行った。本研究プロトコールは岡山大学病院倫理委員会で承認された（1601-030）。

検体収集と準備

肺移植前にはレシピエントとドナーから、また、肺移植後には術後14日間、レシピエントから全血の検体をEDTAチューブに採取し、 -20°C で保存した。DNAはTaqMan Sample-to-SNP™ kitを用いて抽出された。採血後24時間以内に、血液検体は $3,500 \times \text{g}$ で10分間遠心分離され、更に血漿は $16,000 \times \text{g}$ で10分間残存する細胞を除去するため遠心分離された。遊離DNAは血漿からQIAamp Circulating Nucleic Acid Kitを用いて抽出された。

SNP ジェノタイピング

レシピエントとドナーのDNAを区別するため、日本人のMinor allele frequencyが40～50%のSNPのうち、合計35種類のSNPが用いられた。TaqMan primers and probeでDNAを分離し、StepOne™ real-time PCR systemを用いて、SNPのジェノタイピングを施行した。PCR産物はStepOne™ Software Ver2.3で解析した。ドナー特異的SNPの同定のため、安定群では右肺のドナーが、その他の群では急性拒絶反応や感染を発症した肺のドナーが選定された。片側生体肺移植では、ドナーでは異型接合で、ドナーとレシピエントでは異なる同型接合のSNPがドナー特異的SNPと同定された。両側生体肺移植では、一方のドナーでは異型接合や同型接合で、もう一方のドナーとレシピエントでは異なる同型接合のSNPがドナー特異的SNPと同定された。

dd-cf-DNAの定量

ドナー特異的SNPの同定後、デジタルドロップレットPCRによりdd-cf-DNAを測定した。ddPCR supermix for probe (10 μl)や $30 \times$ TaqMan primers and probe set (0.5 μl)などを用いてwater-in-oilのドロップレット（エマルジョン）を作成した。96ウェルのプレート上でサーマルサイクラーを使用してPCRにより増幅し、プレートはBio-Rad QX200 droplet reader上で、QuantaSoft v1.4.0ソフトウェアにより解析された。ポジティブなドロップレットの数を測定し、ポアソン分布に当てはめることでサンプルの濃度を算出した。血中遊離DNAのうち、dd-cf-DNAの占める割合（%）を測定した。

統計学的解析

統計学的解析はJMP11ソフトウェアを使用した。3群間の検討では、連続変数には

Kruskal-Wallis 検定, カテゴリー変数には Pearson のカイ二乗検定を用いた。2 群間の検討では, 連続変数に Mann-Whitney U 検定を用いた。dd-cf-DNA と酸素化の関係には単回帰分析を用いた。p 値<0.05 を統計学的に有意と判断した。

【結果】

患者背景

患者背景や, 生体ドナーから提供された肺容量には, 3 群間で有意な差は見られなかった。安定群では, 生体肺移植後 14 日間, 合併症は認められなかった。感染群や拒絶群でも, 術後 6 日目までは合併症を認めなかったが, 術後 7 日目~14 日目に感染や急性拒絶反応を発症し, いずれも片側肺のみに発症していた。

安定群の dd-cf-DNA の推移

安定群では, dd-cf-DNA は移植直後に最高値を示し, その後, 徐々に減少し, 術後 5 日目には $0.93\pm 0.99\%$ とプラトーに達し, 術後 14 日目まで低値のままであった。

原発性グラフト機能不全と dd-cf-DNA

術後 0 日目と 3 日目に, 原発性グラフト機能不全の指標である酸素化の低下と dd-cf-DNA 量の間に関連関係が認められた (術後 0 日目 $R^2=0.39$, $p=0.022$; 術後 3 日目 $R^2=0.34$, $p=0.046$)。

急性拒絶反応や感染と dd-cf-DNA

安定群では, 術後 5 日目~14 日目の dd-cf-DNA は中央値 1.1% と低値であった。拒絶群では, 発症時の dd-cf-DNA (中央値 12.0%) が安定群より有意に高値だった ($p=0.0001$) が, 感染群 (中央値 4.2%) では安定群と有意な差はなかった ($p=0.051$)。また, 拒絶群と感染群の発症前後 3 日間の比較では, 発症時の dd-cf-DNA は有意に拒絶群で高値であった ($p=0.028$)。

【考察】

本研究では, dd-cf-DNA は生体肺移植後 0, 3 日目の酸素化の低下と有意に関連関係を認め, 原発性グラフト機能不全による酸素化の悪化と関連していた。また, dd-cf-DNA は急性拒絶反応の発症時に, 安定群や感染群より有意に上昇しており, 急性拒絶反応のバイオマーカーとしての可能性を示した。本研究は, 生体臓器移植後の dd-cf-DNA の推移を示した初の報告である。

今回検討した生体肺移植のうち, 特に両側生体肺移植では, レシピエントと 2 人のドナーの合計 3 人から標的 SNP を同定する必要があったため, ドナーが 1 人だけの脳死肺移植や片側生体肺移植より, 同定が困難であった。また, 生体肺移植自体が血縁関係のドナーが多いため, 遺伝情報の類似性から, 脳死肺移植より標的 SNP の候補が少ないという特徴があり, 事前の標的 SNP の効率的なスクリーニングシステムの必要性が示唆された。

dd-cf-DNA と原発性グラフト機能不全との関係はこれまで報告されたことはなかった

が、本研究では、移植後の早期成績に関連する術後 0, 3 日目の酸素化低下と dd-cf-DNA との間に有意な相関関係を認めた。生体肺移植では、脳死肺移植より虚血時間が短いため、術後の酸素化能を評価するのに適していた可能性がある。dd-cf-DNA 量は移植組織量と相関するため、生体肺移植後の dd-cf-DNA 量は脳死肺移植後より低値であった。

脳死肺移植後の報告と同様に、生体肺移植後の急性拒絶反応でも、dd-cf-DNA は有意に感染群や安定群より高値であった。抗体関連拒絶反応では更に高値であり、ステロイド抵抗性で、血漿交換やリツキシマブによる治療効果が発揮されるまで肺組織障害がより高度になるためと考えられた。一方、感染群では dd-cf-DNA の上昇は軽度で、安定群と有意差はなかったため、移植直後の予防的抗生剤の投与も一因かもしれない。しかし、dd-cf-DNA は拒絶群と感染群で有意な差があるので、急性拒絶反応の早期診断・早期治療には有用であると考えられる。

現在、dd-cf-DNA の測定には、デジタルドロップレット PCR か次世代シーケンサーが使用される。本研究では、生体肺移植後早期の検討が目的であるため、短時間で安価に測定できるデジタルドロップレット PCR を用いた。しかし、生体肺移植後の標的 SNP 同定の困難さを考慮すると、次世代シーケンサーの方が適している可能性がある。

本研究の限界は、①症例数が少ないこと、②脳死肺移植ドナーの DNA 解析が日本ではまだ認められていないこと、③レシピエントとドナーの遺伝情報の類似性から標的 SNP を同定できなかった症例が存在すること、④急性拒絶反応が組織学的に診断されていないことである。現時点ではこのような課題はあるが、dd-cf-DNA の測定は生体肺移植後の急性拒絶反応の診断に有益な情報を供与すると考えられる。

【結論】

dd-cf-DNA の上昇は、生体肺移植直後と 72 時間後の酸素化低下や、術後 14 日間の急性拒絶反応の発症と関連する。dd-cf-DNA の測定は、原発性グラフト機能不全の重症度のモニターや、急性拒絶反応を診断する新しい診断システムとして有用である可能性が示唆された。

参考論文

Successful Lung Transplantation Using a Deceased Donor Mechanically Ventilated for Ten Months

(10 か月間、人工呼吸器管理下にあった脳死ドナー肺を使用し肺移植を成功させた一例)

肺移植においてドナー肺の状態は肺移植後成績に直結する因子である。ドナー肺はドナー患者自体の挿管期間が長引くほど人工呼吸関連肺炎や徐神経による浮腫を引き起こしやすくなり臓器が斡旋されてもドナー肺は移植肺として使用できないことが多い。今回我々は10 か月間、人工呼吸管理下にあった脳死ドナー肺を12歳の閉塞性細気管支炎を患っていたレシピエントに移植し成功した一例を報告した。成功した要因としてはドナー管理が早期に導入されていたこと（摘出直前の酸素化が $PaO_2/FiO_2=450$ と比較的高値であった）とレシピエントの状態が比較的安定していたことが挙げられる。